

Requested document:**[JP2002179577 click here to view the pdf document](#)**

ANTITUMOR SUBSTANCE AND ANTITUMOR AGENT

Patent Number: **JP2002179577**

Publication date: **2002-06-26**

Inventor(s): **SAKAGUCHI IKUYO; IKEDA NORIKAZU; MINAMINO YOSHINORI; KATO TAKAYOSHI**

Applicant(s): **CLUB COSMETICS CO LTD**

Requested Patent: [JP2002179577](#)

Application Number: **JP20000377474 20001212**

Priority Number(s):

IPC Classification: **A61K31/7024; A61K35/74; A61P35/00**

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain both a new antitumor substance, especially an antitumor substance having high antitumor effects with slight toxicity and an antitumor agent using the antitumor substance.

SOLUTION: This antitumor substance is a sugar ester of monosaccharides or disaccharides with a fatty acid and comprises the sugar ester of a mycolic acid, especially a <=50C mycolic acid, more desirably a 30-40C myolic acid with the monosaccharides such as glucose or mannose or the disaccharides such as a trehalose. The antitumor agent is obtained by formulating the sugar ester into a parenteral injection, a cream, etc. The sugar ester can be obtained by culturing a bacterium belonging to the genus *Rhodococcus*, especially *Rhodococcus* sp. and is extracted from the cultured microbial cells.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-179577

(P2002-179577A)

(43)公開日 平成14年6月26日 (2002.6.26)

(51)Int.Cl.⁷
A 61 K 31/7024
35/74
A 61 P 35/00
// C 07 H 13/06

F I
A 61 K 31/7024
35/74
A 61 P 35/00
C 07 H 13/06

デマコト[®](参考)
4 C 0 5 7
C 4 C 0 8 6
4 C 0 8 7

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願2000-377474(P2000-377474)

(71)出願人 391043554

株式会社クラブコスメティックス
大阪府大阪市西区西本町2丁目6番11号

(22)出願日 平成12年12月12日 (2000.12.12)

(72)発明者 坂口 育代

大阪府大阪市西区西本町2丁目6番11号
株式会社クラブコスメティックス内

(72)発明者 池田 紀和

大阪府大阪市西区西本町2丁目6番11号
株式会社クラブコスメティックス内

(74)代理人 100104307

弁理士 志村 尚司

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 抗腫瘍物質及び抗腫瘍剤

(57)【要約】

【目的】 新規な抗腫瘍物質、特に抗腫瘍効果が高くしかも毒性の少ない抗腫瘍物質及び当該抗腫瘍物質を用いた抗腫瘍剤を提供する。

【構成】 本発明に係る抗腫瘍物質は、単糖類又は二糖類と脂肪酸との糖エステルであって、ミコール酸、特に炭素数50以下の低級ミコール酸、さらに望ましくは炭素数30~40のミコール酸と、グルコース、マンノースなどの単糖類又はトレハロースなど二糖類との糖エステルからなり、当該糖エステルを用いて注射剤やクリーム剤等に製剤化して本発明に係る抗腫瘍剤を得る。上記糖エステルは、例えば、ロドコッカス属に属する菌、特にロドコッカス菌を培養することによって得ることができ、培養された菌体中から抽出される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単糖類又は二糖類と脂肪酸との糖エステルからなることを特徴とする抗腫瘍物質。

【請求項2】 前記脂肪酸がミコール酸であることを特徴とする請求項1記載の抗腫瘍物質。

【請求項3】 前記脂肪酸の炭素数が30～40であることを特徴とする請求項1又は2のいずれかに記載の抗腫瘍物質。

【請求項4】 請求項1、2又は3のいずれかに記載の糖エステルを含む抗酸菌より抽出された菌体抽出物からなることを特徴とする抗腫瘍物質。

【請求項5】 請求項1、2、3又は4のいずれかに記載の抗腫瘍物質を含有することを特徴とする抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規な抗腫瘍物質、特に抗腫瘍効果が高くしかも毒性の少ない抗腫瘍物質及び当該抗腫瘍物質を用いた抗腫瘍剤に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、癌の治療には外科的療法や薬物療法、放射線療法をレーザー療法などと組み合わせた集中的療法が行われているが、治療に伴う苦痛、転移を考慮すると、薬物療法に対する期待が大きく、これまでに数多くの抗腫瘍剤が開発され使用されている。

【0003】しかしながら、これまでの抗腫瘍剤は、単独では十分な効果を発揮出来ないものや強い副作用のために長期の使用が出来ないものが多く、多剤併用療法が一般的であった。従って、抗腫瘍効果が高くしかも毒性が少なく長期の使用が可能な抗腫瘍剤の開発が望まれていた。

【0004】一方、本発明者らは、ロドコッカス属の菌から抽出分離された糖エステル、特にミコール酸との糖エステルが皮膚保湿効果に有効であることを見い出し、特許出願（特開平9-255549号公報参照）しているが、この糖エステルが抗腫瘍効果を発揮することについては知られてはいない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者らは上記目的を解決すべく銳意研究した結果、上記単糖類又は二糖類と脂肪酸との糖エステルが、腫瘍壞死因子（以下「TNF」と称する。）産生能やNK細胞を活性化させるという抗腫瘍効果を有することを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0006】ここで、TNFは、1975年にオールド（L.J.Old）等によって、ウサギやマウスなどの動物をBCGや嫌気性コリネバクテリア（C.parvum）などの一次刺激剤で感作し、さらにリポポリサッカライド（以下「LPS」と記す。）などの二次刺激剤を投与すると血清中に産生され、腫瘍細胞に出血性壞死を引き起す因子（物質）として発見された（Carswell E.A. et.al., Pro

c.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,72,3666(1975)）。このTNFは、マクロファージから産生される腫瘍傷害性因子で、その抗腫瘍活性は1975年の発見以来、多くの研究によって確認されている（Gresser I, et al., Int.Cancer. 38,771(1986) ; Regenass U, et al., Int.J.Cancer. 39,266(1987) ; Marquet RL et al., Int.J.Cancer. 40,550(1987)など）。

【0007】また、NK細胞は腫瘍細胞に対して極めて早期の防御ラインを示すリンパ球個体群であって、免疫適合宿主又は免疫抑制された宿主における原始腫瘍又は転移性腫瘍の発生防止のため抗原非特異的抗腫瘍免疫に関与している。従ってNK細胞は、癌又は感染症の治療の免疫アプローチのために有効なエフェクター細胞の個体群を作成し、この点でNK細胞の活性化が抗腫瘍免疫に重要であると考えられる。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明に係る抗腫瘍物質は、単糖類又は二糖類と脂肪酸との糖エステルからなることを特徴としている。

【0009】本発明において、上記脂肪酸としてはミコール酸が好適に用いられ、さらに炭素数が30～40のミコール酸であることが好ましい。

【0010】また、本発明に係る抗腫瘍物質は、上記本発明に係る糖エステルを含む抗酸菌より抽出された菌体抽出物からなることを特徴としている。

【0011】本発明に係る抗腫瘍剤は、上記本発明に係る抗腫瘍物質を含有することを特徴としている。

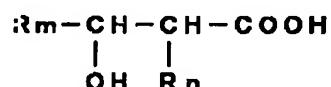
【0012】

【発明の実施の形態】本発明の抗腫瘍物質は、単糖類又は二糖類と脂肪酸との糖エステルからなることを特徴としている。当該糖エステルは、脂肪酸のカルボン酸残基と糖のアルコール残基とがエステル結合したものであって、脂肪酸1分子あるいは2分子以上の脂肪酸が糖にエステル結合したものである。

【0013】上記脂肪酸としては、主として、例えばコリネバクテリウム属、ノカルジア属又はミコバクテリウム属、ロドコッカス属に代表される各種の抗酸菌が産生する脂肪酸が挙げられ、特に、その中でも、次の式1で示されるミコール酸が好適である。

【0014】

【式1】



【0015】ここにおいて、式1中、RmおよびRnはそれぞれアルキル残基を示すが、RmおよびRnは、いずれも直鎖状又は分岐状のいずれであっても良い。またRm、Rnはそれぞれ不飽和結合、望ましくは2重結合を有しているものがよく、通常のアルキル残基よりも広い概念である。

【0016】また、本発明におけるミコール酸はその総炭素数が30～40であるものが好ましく、総炭素数が50を越えると毒性が増強される恐れがある。

【0017】また、当該ミコール酸とエステル結合する糖としては、グルコース、マンノース、フルクトースなどの单糖類、あるいは、スクロース、トレハロースをはじめとする各種の二糖類が挙げられる。これらの糖は、アルドース、ケトースのいずれでもよく、また、鎖状あるいは環状構造のいずれの構造をしていてもよい。従って、本発明に係る糖エステルとしては、例えば、トレハロース-6, 6'-ジミコレート、トレハロース-6-モノミコレート、グルコース-6-モノミコレート、マンノース-6-ミコレート、フルクトース-6-ミコレートが挙げられる。

【0018】本発明に係る糖エステル、主としてミコール酸糖エステルは上記抗酸菌、例えば、ロドコッカス属に属する菌、特にロドコッカス菌を培養することによって得ることができる。当該化合物は主として菌体中に生成されるので、培養された菌体から抽出することによって得ることができる。

【0019】その際の培養方法としては、従来から用いられている公知の合成培地及び天然培地を用いることができ、特にロドコッカス属に属する微生物の培養に用いられる培地であれば、すべての培地が使用できる。

【0020】例えば生育炭素源としては、グルコース、フルクトース、マンノースなどの单糖類を用いることができる。また窒素源としては、例えば硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機窒素化合物、ペプトン、肉エキス、コーンスティーブリカ等の有機窒素化合物が利用できる。また無機塩としてナトリウム、カリウム、カルシウム、亜鉛、マグネシウム、マンガン、リン酸等を、さらに成長因子として、各種ビタミン、アミノ酸類又はそれらを豊富に含む酵母エキスを適宜加えることにしてよい。

【0021】培地のpHは5～9、特に7～7.5が至適範囲であり、培養温度は10～40℃、特に30～40℃が適している。培養は液体培養又は固体培養で好気的条件下に行なうことが好ましい。培養時間は、通常3～14日程度とするのが適当である。

【0022】このようにして得られる菌体から、本発明のミコール酸糖エステルを得るには、菌体成分を採取する通常の方法を用いればよい。例えば、培養液を遠心分離して集菌したのち、有機溶媒を加えて溶媒抽出する。例えば、有機溶媒としてはクロロホルムとメタノールの混液や、クロロホルムとメタノール・アセトンの混液など、クロロホルムなどの疎水性溶媒やメタノールやアセトンなどの親水性溶媒とを単独あるいは混合したものを使うことよい。

【0023】次に抽出した菌体成分をシリカゲルやモレ [PYG (M, F) 培地の組成]

キュラシープなどに吸着させ、その後、先に述べたような溶媒で溶出して、さらに精製を加える。そして、溶媒に対する溶解度差やイオン結合力の差などを利用し、それぞれ単独の方法で又は2つ以上の方法を適当に組み合わせて、さらには同様の操作を数回繰り返すことにより、ミコール酸糖エステルを、炭素数が異なるミコール酸糖エステルの混合物ではあるが、ほぼ純粋な物質として分離精製することができる。

【0024】こうして精製されたミコール酸糖エステルはそのまま、あるいは適当な溶媒で希釈したり、さらに適当な賦形剤と混合することにより、抗腫瘍物質として用いることができ、慣用の製剤化手段によって任意の形態に製剤化することができる。本発明に係る抗腫瘍剤である具体的な製剤としては、例えば錠剤やカプセル剤、散剤、リポソーム、液剤等の各種経口剤、リポソーム、乳濁注射剤、生理食塩水などを使用した懸濁性注射剤等の注射剤等が例示される。また皮膚外用剤として各種の軟膏剤、クリーム剤等が例示され、内服外用を問わず各種の製剤にして提供できるものである。

【0025】また、ミコール酸糖エステルは、菌体から上述した方法により抽出し、純粋なものにまで精製する必要もなく、また各種ミコール酸糖エステルの混合物として用いることとしてもよい。さらに、毒性が発揮されない程度に粗精製した菌体抽出物として用いてもよい。もちろん合成によってもミコール酸糖エステルを得ることができ、合成した場合には純度の高いミコール酸糖エステルを得ることができる。

【0026】このようにして得られる本発明に係る抗腫瘍剤は、1日1回から数回に分けて適用することができ、その投与量は症状に応じて適宜増減することができる。また、抗腫瘍剤中の濃度としても、適宜その使用目的、症状などに応じて適宜増減できるものである。さらに、本発明の抗腫瘍剤には、本発明の抗腫瘍物質のみならず、マイトイシンCやナイトロジエンマスター等の他の抗腫瘍物質を配合したり、あるいは他の抗腫瘍剤を併用してもよいのは言うまでもない。

【0027】

【実施例】以下に本発明の実施例について具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1)

〔菌体の培養〕ロドコッカス菌(Rhodococcus sp. 4306)を1白金耳採り、pH 7.5に調整した以下に示す組成の培養用PYG (M, F) 培地200mlに植菌し、37℃で5～7日間振とう培養法によって前培養した。この前培養菌液10～50ml(前培養菌液の菌体濃度により液量を適宜調整する。)を同じ組成のPYG (M, F) 培地1.5lに加え、37℃で5～7日間本培養した。

· polypeptone (日本製薬製)	0.5w/w%
· yeast extract (DIFCO製)	0.5w/w%
· 糖(D(+)-Glucose、和光純薬製)	1w/w%

ただし、糖にはD(+)−グルコース以外にも、D(+)−マンノース、D(−)−フルクトースを用いることもできる。

【0028】〔ミコール酸糖エステルの抽出精製〕上記で得られた培養菌液を7500rpmで30分間遠心分離し、菌体を集菌した。次に集菌された菌体を、クロロホルムとメタノールの混液(容量比2:1)を加え、超音波モジナイザーにて15分間超音波処理を行った。この処理した溶液を分液ロートに移し、水を加えて2層に分離させ有機溶媒層を分取する。そして、分取した溶媒をエバボレーターにて濃縮し、脂質成分を得た。

【0029】さらに、この脂質成分を薄層クロマトグラフィーにより展開して分離精製した。つまり、脂質成分を少量のクロロホルムなどの適当な溶媒に溶かし、シリカゲルからなる分取用薄層板(UNIPLATE SILICA GEL GM ERCK社製)上にスポットした。そして、クロロホルムとメタノール、アセトン、酢酸(容量比90:10:6:1)にて展開した。次に、この薄層板上で分離された各脂質部分を搔き取り、搔き取ったシリカゲルを、それぞれガラスカラムに充填して、クロロホルムとメタノールの混液で溶出し、各脂質が薄層クロマトグラム上で、单ースポットになるまで繰り返し行う。最後に、エバボレーターで溶媒を留去して、トレハロース-6,6'-ジミコレート、トレハロース-6-モノミコレート、グルコース-6-モノミコレート、マンノース-6-ミコレート、フルクトース-6-ミコレートを得た。これらの詳細な構造については、上記特開平9-255549号公報を参照されたい。

【0030】次にこうして得られたミコール酸糖エステルのうち、トレハロース-6,6'-ジミコレート(以下TDMと称する。)につき、TNF産性、腫瘍特異的キラー活性、NK活性を指標としてその抗腫瘍効果を確認した。

【0031】(TNF産性) 雄性マウス(4~6週齢)の腹腔内に10w/v%プロテオースペプトン液を2ml投与し、4日後にマウスの腹腔内を冷したリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、腹腔液を採取した。この腹腔液を10000rpmで10分間遠心分離して、腹腔細胞を得た。この得られた腹腔細胞を5%仔ウシ血清含有の培地(RPMI培地)に、 1×10^6 cells/mlとなるように播種し、TDMを $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ そして $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるようにそれぞれ添加し、24時間培養した。その後、培養上清中のTNF産生量をELISA法を用いて測定を行った。その結果を図1に示す。

【0032】(腫瘍特異的キラー活性) P-815細胞を 2×10^6 DBAマウスの右胸部に皮内接種し、7日後に生着増殖した腫瘍を外科的に排除した。さらに7日後に

マウス脾臓を摘出して、単細胞浮遊液とし、マイトマイシンC溶液中で処理したP-815細胞とともに10%FBS含有RPMI中で培養した。培養5日後、回収した生細胞をエフェクター細胞として腫瘍特異的キラー活性を測定した。腫瘍特異的キラー活性の測定には ^{51}Cr で標識したP-815細胞を標的細胞としてエフェクター/ターゲット比(E/T ratio)が100、50、25となるようにしてそれぞれ4時間培養後、標的細胞の傷害性をガンマカウンターで測定した。Specific lysis(%)は常法により下記計算式により算出した。なおTDMはP-815細胞を皮内接種した同日に尾静脈により投与した。その結果を表1に示す。

$$\text{Specific lysis (\%)} = \{ \text{TDM投与時の測定値} / \text{TDM非投与時の測定値} \} \times 100$$

【0033】

【表1】

腫瘍特異的キラー活性

E/T ratio	25	50	100
Specific lysis (%)	9.8	14.5	24.0

【0034】(NK活性) TDM(1mg/匹)をマウス尾静脈内に投与し、6日後にマウス脾臓を摘出して、単細胞浮遊液とし、 ^{51}Cr で標識したYAC-1細胞を標的細胞としてエフェクター/ターゲット比(E/T ratio)が100、50、25となるようにしてそれぞれ4時間培養後、標的細胞の傷害性をガンマカウンターで測定した。Specific lysis(%)は腫瘍特異的キラー活性を測定した場合と同様にしてNK活性を算出した。その結果を表2に示す。

【0035】

【表2】

NK活性

E/T ratio	25	50	100
Specific lysis (%)	13.0	18.0	23.0

【0036】図1及び表1並びに表2から分かるように、実施例におけるTDMは良好にTNF産性を誘導させるだけでなく、腫瘍特異的キラー活性、NK活性を著しく向上させることが確認された。

【0037】次に上記TDMを使用して各種抗腫瘍剤を製造したところ、良好に製剤化することができた。(製剤例1) 下記処方による軟膏剤を常法に従って製造した。

TDM	1 g
白色ワセリン	9 g
ポリエチレングリコール400	75 g
ポリエチレングリコール4000	15 g
	全量 100 g

【0038】(製剤例2) 下記処方によりなるリポソームの懸濁性注射剤を常法に従って製造した。

TDM	300 mg
卵黄 fosfатидилхолина	720 mg
生理食塩水	適量
	全量 5 ml

【0039】(製剤例3) 下記処方によりなる非水性溶剤を用いた注射剤を常法に従って製造した。

TDM	100 mg
オリーブ油	適量
	全量 1 ml

【0040】(製剤例4) 下記処方によりなる乳濁性注射剤を常法に従って製造した。

TDM	300 mg
オリーブ油	100 mg
d1- α -トコフェロール	50 mg
ポリソルベート80	80 mg
セスキオレイン酸ソルビタン	60 mg
精製水	適量
	全量 5 ml

【0041】(製剤例5) 下記処方によりなる錠剤を常法に従って製造した。

10錠中	
TDM	2 g
乳糖	8 g
ステアリン酸マグネシウム	0.1 g

【0042】(製剤例6) 下記処方によりなるクリーム剤を常法に従って製造した。

TDM	1 g
セタノール	3 g
ステアリン酸	4 g
流動パラフィン	20 g
濃グリセリン	5 g
自己乳化型モノステアリン酸グリセリン	5 g
ショ糖脂肪酸エステル	3 g
パラオキシ安息香酸ブチル	0.2 g
精製水	58.8 g
	全量 100 g

【0043】

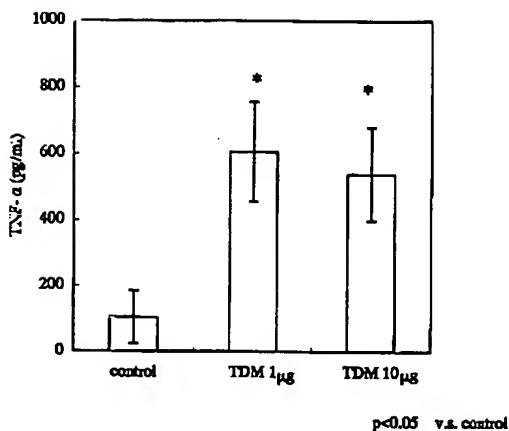
【発明の効果】本発明によれば、TNF産生能やNK細胞を著しく活性化させ、抗腫瘍効果の高い新規な抗腫瘍

物質及び抗腫瘍剤を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】TDMによるTNF産生能を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 南野 美紀
大阪府大阪市西区西本町2丁目6番11号
株式会社クラブコスメチックス内

Fターム(参考) 4C057 BB02 BB03
4C086 AA01 AA02 EA03 MA01 MA04
NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC16 BC17 BC29
BC72 CA14 MA01 NA14 ZB26

(72)発明者 加藤 敬香
大阪府大阪市西区西本町2丁目6番11号
株式会社クラブコスメチックス内